

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-234110

(43) 公開日 平成8年(1996)9月13日

(51) Int.Cl. <sup>4</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 2 B 21/00			G 0 2 B 21/00	
21/16			21/16	
21/18			21/18	
21/32			21/32	
21/36			21/36	

審査請求 未請求 請求項の数4 F D (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願平7-59948

(22) 出願日 平成7年(1995)2月23日

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 大瀧 達朗

東京都品川区西大井1丁目6番3号 株式会社ニコン大井製作所内

(72) 発明者 豊田 修治

東京都品川区西大井1丁目6番3号 株式会社ニコン大井製作所内

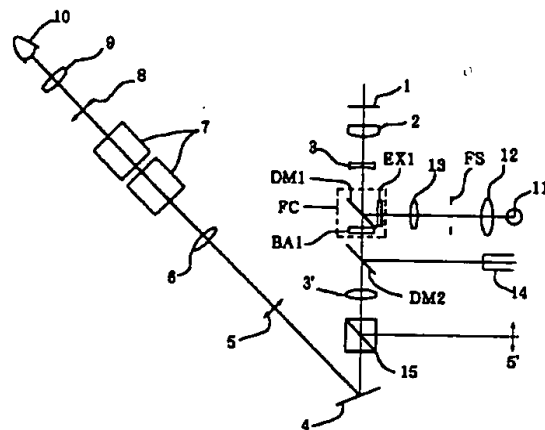
(74) 代理人 弁理士 山口 孝雄

(54) 【発明の名称】 落射蛍光顕微鏡

(57) 【要約】

【目的】 特殊な特性を有するダイクロイックミラーを使用することなく、落射蛍光観察法と光ピンセット法とが可能な落射蛍光顕微鏡を提供すること。

【構成】 本発明においては、励起光照射光学系と、観察光学系と、光ピンセット手段とを備えた落射蛍光顕微鏡において、前記励起光照射光学系は、励起光を供給するための第1光源と、前記観察光学系の光路中に配置され、前記第1光源からの励起光を標本へ導くとともに前記標本からの蛍光を前記観察光学系の光路へ導く第1波長分別手段とを有し、前記光ピンセット手段は、レーザー光を供給するための第2光源と、前記観察光学系の光路中に配置され、前記第2光源からのレーザー光を前記標本へ導くとともに前記標本からの蛍光を前記観察光学系の光路へ導く第2波長分別手段とを有する。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 落射蛍光観察用の励起光を標本に照射するための励起光照射光学系と、前記励起光に対する標本からの蛍光を対物レンズを介して結像させ前記標本の像を観察するための観察光学系と、前記標本の所定位置にレーザー光を集光して前記標本中の物体を前記所定位置で光学的に捕捉するための光ピンセット手段とを備えた落射蛍光顕微鏡において、

前記励起光照射光学系は、前記励起光を供給するための第1光源と、前記観察光学系の光路中に配置され、前記第1光源からの励起光を前記標本へ導くとともに前記標本からの蛍光を前記観察光学系の光路へ導く第1波長分別手段とを有し、

前記光ピンセット手段は、前記レーザー光を供給するための第2光源と、前記観察光学系の光路中に配置され、前記第2光源からのレーザー光を前記標本へ導くとともに前記標本からの蛍光を前記観察光学系の光路へ導く第2波長分別手段とを有することを特徴とする落射蛍光顕微鏡。

【請求項2】 前記観察光学系の光路中に配置され前記標本からの蛍光の一部を取り出すための光路分割手段と、該光路分割手段を介して取り出された蛍光が形成する前記標本の像を撮影するための撮影手段とを有する撮影光学系をさらに備えていることを特徴とする請求項1に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項3】 前記第1波長分別手段および前記第2波長分別手段は、前記観察光学系の平行光束光路中に配置されていることを特徴とする請求項1または2に記載の落射蛍光顕微鏡。

【請求項4】 前記第1光源は、前記励起光を選択的に透過するための励起フィルタを有し、前記第1波長分別手段と前記励起フィルタとは、前記観察光学系の光路に対して一体的に挿脱自在に形成されていることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載の落射蛍光顕微鏡。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】本発明は落射蛍光顕微鏡に関し、特に落射蛍光照明装置と光ピンセットとを備えた顕微鏡に関する。

## 【0002】

【従来の技術】顕微鏡の観察方法として、水銀ランプ等の光源からの短い波長の励起光を標本上の観察視野領域に照明し、標本から発する長い波長の蛍光を観察する落射蛍光観察法がある。具体的には、対物レンズから拡大像に至る観察光学系の平行光束光路中に配置されたダイクロイックミラーによって水銀ランプ等からの短い波長の励起光を反射し、反射光を対物レンズを介して標本に照明する。また、最近では、細胞や染色体などの微細な対象物を光学的に捕捉する方法として、レーザー光を用

いた光ピンセット法が知られている。

【0003】以下、光ピンセット法の原理について説明する。光ピンセット法では、開口数の大きな対物レンズを介して強力なレーザー光を標本上に集光させる。このとき、標本中のたとえばビーズのような微小な物体とたとえば水のような周囲の溶液との間の屈折率の違いにより、ビーズと水との境界面においてレーザー光の屈折が起こる。このレーザー光の屈折によりビーズに作用するモーメント力を利用して、レーザー光の集光点の近くにビーズを光学的に捕捉する。捕捉可能な物体はビーズに限られることなく、細胞や染色体のような生物標本中の微細物体でも同様に捕捉可能である。顕微鏡では、光ピンセット法を利用した様々な応用が考えられる。

【0004】光ピンセットを組み込んだ従来の落射蛍光顕微鏡では、落射蛍光観察用の励起光を標本に照射するための励起光照射光学系の光路を利用して、レーザー光を標本に入射させている。すなわち、励起光を供給する光源と観察光学系の光路中に配置された第1ダイクロイックミラーとの間の光路中に別の第2ダイクロイックミラーを設け、この別の第2ダイクロイックミラーを介してレーザー光を励起光照射光学系の光路中に取り込んでいる。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】上述のような従来の落射蛍光顕微鏡では、観察光学系の光路中に配置された第1ダイクロイックミラーが、励起光のような短波長の光およびレーザー光のような長波長の光とともに反射するとともに、標本からの蛍光を透過するという特殊な特性を有する必要がある。たとえば、UV励起法を用いて蛍光観察を行う場合、340～390nmの光（励起光）および800nm以上の光（レーザー光）を反射し、且つ400～700nmの光（蛍光）を透過するという特殊な特性を第1ダイクロイックミラーに付与しなければならない。このため、第1ダイクロイックミラーの製造が困難となり、製造コストも高くなってしまふ。

【0006】ところで、光ピンセットが組み込まれていない従来の落射蛍光顕微鏡では、励起光の波長を選択するための励起フィルタと第1ダイクロイックミラーとが交換可能なフィルタカセットを構成している。そして、励起法を変えて落射蛍光観察を行うような場合には、適当なフィルタカセットと交換することにより、第1ダイクロイックミラーと励起フィルタとを一体的に交換している。

【0007】しかしながら、上述のような従来の落射蛍光顕微鏡では、第2ダイクロイックミラーよりも励起光の光源側に励起フィルタを配置しなければならない。したがって、たとえばUV励起法からB励起法等の他の励起法に変えて落射蛍光観察を行うような場合、互いに離間して配置された第1ダイクロイックミラーと励起フィルタとを個別に交換しなければならない。その結果、顕

微鏡の構成が複雑になるばかりでなく、操作性も悪いという不都合があった。

【0008】本発明は、前述の課題に鑑みてなされたものであり、特殊な特性を有するダイクロイックミラーを使用することなく、落射蛍光観察法と光ピンセット法とが可能な落射蛍光顕微鏡を提供することを目的とする。

【0009】

【課題を解決するための手段】前記課題を解決するために、本発明においては、落射蛍光観察用の励起光を標本に照射するための励起光照射光学系と、前記励起光に対する標本からの蛍光を対物レンズを介して結像させ前記標本の像を観察するための観察光学系と、前記標本の所定位置にレーザー光を集光して前記標本中の物体を前記所定位置で光学的に捕捉するための光ピンセット手段とを備えた落射蛍光顕微鏡において、前記励起光照射光学系は、前記励起光を供給するための第1光源と、前記観察光学系の光路中に配置され、前記第1光源からの励起光を前記標本へ導くとともに前記標本からの蛍光を前記観察光学系の光路へ導く第1波長分別手段とを有し、前記光ピンセット手段は、前記レーザー光を供給するための第2光源と、前記観察光学系の光路中に配置され、前記第2光源からのレーザー光を前記標本へ導くとともに前記標本からの蛍光を前記観察光学系の光路へ導く第2波長分別手段とを有することを特徴とする落射蛍光顕微鏡を提供する。

【0010】本発明の好ましい態様によれば、前記観察光学系の光路中に配置され前記標本からの蛍光の一部を取り出すための光路分割手段と、該光路分割手段を介して取り出された蛍光が形成する前記標本の像を撮影するための撮影手段とを有する撮影光学系をさらに備えている。

【0011】

【作用】本発明の落射蛍光顕微鏡では、観察光学系の光路中に配置されたダイクロイックミラーのような第1波長分別手段を介して落射蛍光観察用の励起光を標本に照射するとともに、観察光学系の光路中に配置された別のダイクロイックミラーのような第2波長分別手段を介して光ピンセット用のレーザー光を標本に照射する。具体的には、たとえば、蛍光観察用の励起光を第1ダイクロイックミラーで全反射して観察光学系の光路中に導くとともに、光ピンセット用のレーザー光を第2ダイクロイックミラーで全反射して観察光学系の光路中に導く。

【0012】こうして、特殊な特性を有するダイクロイックミラーを使用することなく、蛍光観察用の励起光と光ピンセット用のレーザー光とを照射効率良く対物レンズを介して標本上に導くことができる。その結果、標本中の微細物体を光学的に捕捉するための必要なレーザー光の出力を最小限に抑えることができる。また、観察光学系の光路中にハーフプリズムのような光路分割手段を配置し、ハーフプリズムを介して取り出した蛍光が形成

する標本の像をビデオカメラ等の撮影手段により撮影することもできる。

【0013】

【実施例】以下、本発明の実施例を、添付図面に基づいて説明する。図1は、本発明の実施例にかかる落射蛍光顕微鏡の構成を概略的に示す図である。図示の装置は倒立型の顕微鏡であり、観察すべき標本1の図中下方には対物レンズ2が配置されている。そして、この対物レンズ2の下方から落射蛍光照明が施されるようになっている。落射蛍光用の光源11からの光束は、コレクタレンズ12によって集光されて一旦結像した後、リレーレンズ13および励起フィルタEX1を介してダイクロイックミラーDM1に入射する。

【0014】なお、コレクタレンズ12とリレーレンズ13との間の結像位置には、視野絞りFSが配置されている。また、ダイクロイックミラーDM1は、顕微鏡の観察光学系のリレーレンズ系(3、3')の平行光束光路中に配置されている。ダイクロイックミラーDM1により図中上方に反射された落射蛍光用の光束は、対物レンズ2を介して標本1の観察視野領域を照明する。標本1と視野絞りFS1とは光学的に共役の位置にあり、観察視野領域は視野絞りFSの開口部の形状および大きさに依存して規定される。

【0015】なお、本実施例ではUV励起法を用いており、励起フィルタEX1は波長が340~390nmの光すなわち励起光を透過する特性を有する。一方、ダイクロイックミラーDM1は波長が400nm以下の光を反射し、400nmを超える光を透過する特性を有する。このように、光源11、コレクタレンズ12、視野絞りFS、リレーレンズ13、励起フィルタEX1、ダイクロイックミラーDM1、および対物レンズ2は、落射蛍光顕微鏡の励起光照射光学系を構成している。

【0016】こうして、光源11からの励起光が照射された標本で発生した蛍光のうち波長が400nmを超える蛍光は、対物レンズ2によって集光された後、リレーレンズ系(3、3')中のダイクロイックミラーDM1を透過する。さらに、420nm以上の波長を有する光を透過するバリアフィルタBA1を介して、波長が400未満の蛍光が除去される。このように、観察に有害な光が除去された後、標本1からの蛍光はハーフプリズム15を介してミラー4に入射する。そして、ミラー4において図中左斜め上方に反射された光は、拡大像5を形成する。

【0017】拡大像5からの光は、リレーレンズ系6およびプリズム7を介して再結像し、像8が形成される。像8は、接眼レンズ9を介して観察者の肉眼10によって観察される。このように、対物レンズ2、リレーレンズ系(3、3')、ミラー4、リレーレンズ系6、プリズム7および接眼レンズ9は、顕微鏡の観察光学系を構成している。なお、本実施例におけるUV励起法のため

のダイクロイックミラーDM1、励起フィルタEX1およびバリアフィルタBA1の分光透過率特性を、図2に示す。

【0018】図1中破線で示すように、ダイクロイックミラーDM1、励起フィルタEX1およびバリアフィルタBA1は、観察光学系の光路に対して一体的に挿脱自在な、すなわち交換可能なフィルタカセットFCを形成している。そして、このフィルタカセットFCは、たとえばB励起法、V励起法、G励起法等の他の励起法用のフィルタカセットと適宜交換されるようになっている。したがって、観察光学系の光路に対して一体的に挿脱自在なフィルタカセットを交換するだけで、所望の励起法を操作性良く選択することができる。

【0019】たとえば、B励起法を用いる場合、ダイクロイックミラーDM1'、励起フィルタEX1'およびバリアフィルタBA1'からなるフィルタカセットFC'と交換する。ここで、ダイクロイックミラーDM1'は、波長が510nm以下の光を反射し、510nmを超える光を透過する特性を有する。また、励起フィルタEX1'は、波長が410~460nmの励起光を透過する特性を有する。さらに、バリアフィルタBA1'は、520nm以上の波長を有する光を透過する特性を有する。なお、B励起法用のフィルタカセットFC'を構成するダイクロイックミラーDM1'、励起フィルタEX1'およびバリアフィルタBA1'の分光透過率特性を、図3に示す。

【0020】図1の落射蛍光顕微鏡はさらに、標本1中の微細物体を光学的に捕捉するための光ピンセット手段を備えている。光ピンセット手段は、たとえば波長が1064nmのレーザー光を発するNdYAGレーザー光源14を有する。光源14からのレーザー光は、観察光学系のリレーレンズ系(3、3')の平行光束光路中に配置されたダイクロイックミラーDM2に入射する。ダイクロイックミラーDM2は、可視光を透過し且つ赤外光を反射するように、波長が800nm以下の光を透過し且つ波長が800nmを超える光を反射する特性を有する。このようなダイクロイックミラーDM2の分光透過率特性を、図4に示す。

【0021】ダイクロイックミラーDM2により図中上方に反射されたレーザー光は、バリアフィルタBA1、ダイクロイックミラーDM1を透過し、対物レンズ2に入射する。対物レンズ2に入射したレーザー光は集光され、標本1上の所定位置にレーザースポットを形成する。こうして、光ピンセット法によって、レーザー集光点の近傍において、標本1中の微小物体を光学的に捕捉することができる。このように、レーザー光源14、ダイクロイックミラーDM2および対物レンズ2は、光ピンセット手段を構成している。

【0022】また、本実施例では、観察光学系の光路中にハーフプリズム15のような光路分割手段が設けられ

ている。したがって、ハーフプリズム15を介して標本1からの蛍光の一部が観察光学系から取り出され、取り出された蛍光が標本1の拡大像5'を形成する。こうして、いわゆるサイドポートに形成された標本1の拡大像5'を、図示を省略したビデオカメラ等の撮影手段により撮影することができる。

【0023】なお、上述の実施例では、倒立型の顕微鏡を例にとって本発明を説明しているが、一般の正立型の顕微鏡にも本発明を適用することができる。また、上述の実施例では、蛍光観察用のダイクロイックミラーDM1が光ピンセット用のダイクロイックミラーDM2よりも標本側に配置されているが、これらの2つのダイクロイックミラーの配置は逆であってもよい。さらに、上述の実施例では、落射蛍光法としてUV励起法にしたがう構成を示したが、他の適当な励起法を用いることもできる。

【0024】また、上述の実施例では、励起光を反射し且つ蛍光を透過するダイクロイックミラーやレーザー光を反射し且つ蛍光を透過するダイクロイックミラーを用いた例を示している。しかしながら、励起光を透過し且つ蛍光を反射するダイクロイックミラーやレーザー光を透過し且つ蛍光を反射するダイクロイックミラーを用いてもよい。また、ダイクロイックミラーに代えて、ダイクロイックプリズムや他の適当な波長分別手段を使用することもできる。

【0025】

【効果】以上説明したように、本発明によれば、蛍光観察用の励起光および光ピンセット用のレーザー光をそれぞれ個別のダイクロイックミラーのような波長分別手段を介して観察光学系の光路中に取り込んでいる。したがって、特殊な特性を有するダイクロイックミラーを使用することなく、励起光とレーザー光とを照射効率良く標本上に導くことができる。その結果、レーザー光の出力を最小限に抑えることができる。また、本発明によれば、蛍光観察用の励起フィルタとダイクロイックミラーとが交換可能なフィルタカセットを構成し、このフィルタカセットを他の励起法用のフィルタカセットと交換するだけで、所望の励起法による蛍光観察を操作性良く行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の実施例にかかる落射蛍光顕微鏡の構成を概略的に示す図である。

【図2】本実施例におけるUV励起法のためのダイクロイックミラーDM1、励起フィルタEX1およびバリアフィルタBA1の分光透過率特性を示す図である。

【図3】B励起法のためのダイクロイックミラーDM1'、励起フィルタEX1'およびバリアフィルタBA1'の分光透過率特性を示す図である。

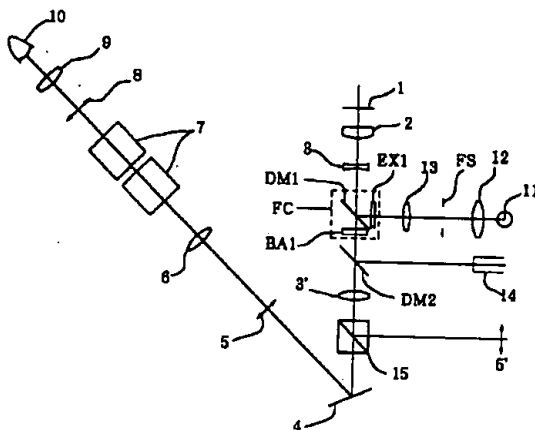
【図4】光ピンセット用のダイクロイックミラーDM2の分光透過率特性を示す図である。

## 【符号の説明】

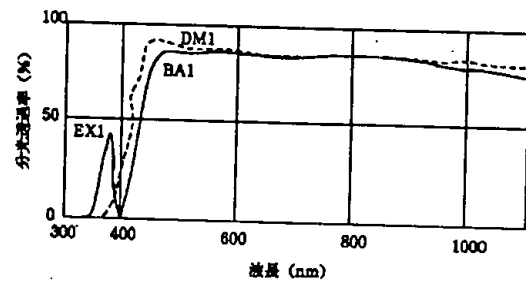
- 1 標本  
2 対物レンズ  
3、3' リレーレンズ系  
4 ミラー  
5、8 像面  
7 プリズム  
9 接眼レンズ  
10 肉眼  
11 励起光光源

- 12 コレクタレンズ  
14 レーザー光源  
15 ハーフプリズム  
EX1 励起フィルタ  
BA1 バリアフィルタ  
DM1 ダイクロイックミラー  
DM2 ダイクロイックミラー  
FC フィルタカセット  
FS 視野絞り

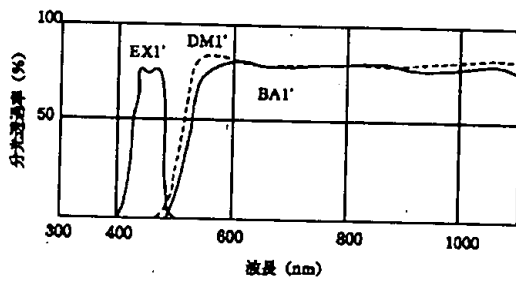
【図1】



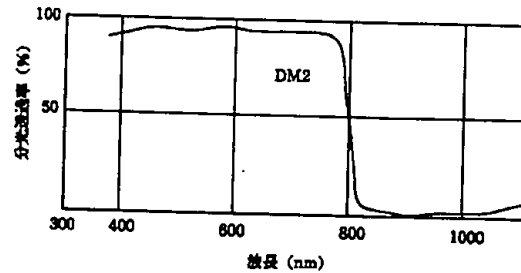
【図2】



【図3】



【図4】



JPAB

CLIPPEDIMAGE= JP408234110A

PAT-NO: JP408234110A

DOCUMENT-IDENTIFIER: JP 08234110 A

TITLE: VERTICAL ILLUMINATING MICROSCOPE

PUBN-DATE: September 13, 1996

INVENTOR-INFORMATION:

NAME

OTAKI, TATSURO

TOYODA, SHUJI

ASSIGNEE-INFORMATION:

NAME

COUNTRY

NIKON CORP

N/A

APPL-NO: JP07059948

APPL-DATE: February 23, 1995

INT-CL\_(IPC): G02B021/00; G02B021/16 ; G02B021/18 ; G02B021/32 ; G02B021/36

ABSTRACT:

**PURPOSE:** To make it possible to efficiently introduce an exciting light for fluorescent observation and a laser beam for optical tweezers onto a sample without using a dichroic mirror having special characteristics by taking the exciting light and the laser beam via respectively discrete wavelength discriminating means into an observation optical system.

**CONSTITUTION:** The sample 1 is irradiated with the exciting light for vertical illuminating fluorescent observation via the first wavelength discriminating means, such as dichroic mirror DM1 arranged in the optical path of the observation optical system. Further, the sample 1 is irradiated with the laser beam for optical pincettes via the second wavelength discriminating means, such as dichroic mirror DM2 arranged in the optical path of the observation optical system. Namely, the exciting light for fluorescent observation is totally reflected by the first dichroic mirror DM1 and is introduced into the optical path for the observation optical system and the laser beam for optical pincettes is totally reflected by the second dichroic mirror DM2 and is introduced into the optical path for the observation optical system. The exciting light and the laser beam are introduced onto the sample via an objective lens.

**COPYRIGHT:** (C)1996,JPO